

---

## 最終講義

---

### 「私の目指した病理学 ―機能と形態の融合―」

2015年2月25日

高松哲郎\*

京都府立医科大学細胞分子機能病理学

### Pathology should have Bearing on both Morphology and Physiology of Disease

Tetusro Takamatsu

*Department of Pathology and Cell Regulation,  
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

こんにちは、高松です。お忙しいところを集まっていただき有難うございます。今日は「私の目指した病理学、機能と形態の融合」というタイトルでお話をさせていただきます。最終講義ですので対象は学生諸君です。3回生の学生諸君にわかるようになるべくやさしく話すつもりですが、ほとんどが研究の話ですので、もし途中でわからない点があったら質問してください。

みなさんたぶん病理学というのは、形態学であると考えていると思います。確かにその通りで、形態に立脚して私たちは仕事をしています。しかし形態だけではどうしてもわからないことがあります。そうした場合どうしたらよいのか。また、機能と形態は相反するものかといった話をしたいと思います。

私の経歴を簡単にお示します。私は1974年、昭和49年に本学を卒業し直ぐに小児科に入りました。その頃はダイレクトに医局に入りましたので、小児科で研修医をやってから、2年間福井愛育病院という病院に勤めました。福井愛

育病院というところがちょっと特殊な病院でして、母と子の病院という立場だけではなく、隣に我が国の心臓外科の草分けである榊原任氏がその設立に尽力した福井循環器病院があって、心臓病の勉強もさせていただきました。学生時代から循環器が好きだった私は喜んでこの病院に出張したわけです。その後小児科の大学院に入りましたが、研究は第二病理でやりました。大学院を卒業してからは、山科にあります愛生会病院に勤めた後、82年から本学の第二病理の助手になりました。その後ずっと病理ですが、途中で一度留学しております。

### 病理学とは

今日は以下の内容でお話ししたいと思います。

1. 病理学とは
2. 病理学の歴史と藤田病理
3. 顕微測光から共焦点顕微鏡
4. 不整脈原性基質

---

平成28年1月1日受付

\*連絡先 高松哲郎 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地  
ttakam@koto.kpu-m.ac.jp

5. 医療支援システム
6. Non-junctional Cx43
7. おわりに

図1は、学生の人たちに病理学の講義の最初の日にいつも見せているものです。病理学 pathology は pathos + logos であり、病気の理(ことわり)を勉強する学問です。病気の理とは何かといいますと、病因 etiology と発症機序 pathogenesis に集約されます。臨床症状から、分子や細胞や組織における一定の構造や機能異常に共通の現象を見つけることによって病因や発症機序を解明し、そこから疾患体系を作って

いくというのが病理学なのですが、なかでも重要なのがこの病因や発症機序であり、疾患を扱うとき常に考えていなければならないものであると講義してきました。

これをまだわかっていない疾患に当てはめようとしたら何が必要か。つまり病気の本質を知るには病因と発症機序、特に発症機序を知らなければならないのですが、そのためにどういった考え方や手段でアプローチすればよいのか、私はこれを病理で学んできたのであり、また考えるのが楽しみでもありました。

## 病理学の歴史と藤田病理

まず歴史から紐解いていきたいと思います。病理学の歴史というのは Hippocrates の時代の体液病理学に始まります(図2)。血液、粘液、黄胆汁、黒胆汁というものがあって、これらのバランスが崩れることによって病気が起きる。これが当時の発症機序の考えでした。ですからバランスを崩したものを、例えば瀉血してやると病気が治ると考えられていました。これに対して、人体は有形成分であるアトムからなり、アトムの異常によって発病するというアスクレピアデスらの固体病理学は、16~17世紀に再認識

### 病理学を学ぶにあたって

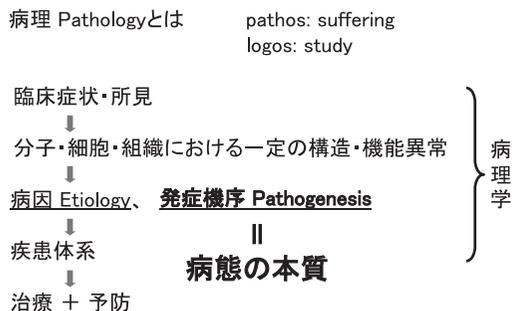


図1

## 病理学の歴史

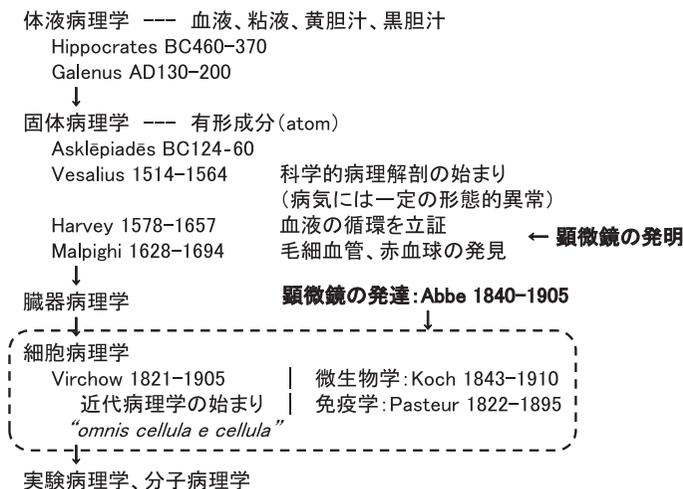


図2

されました。科学的な病理解剖が始まり、病気には一定の形態学的特徴がある、と Vesalius が主張しました。Harvey が血液の循環を立証し、Malpighi が毛細血管や赤血球を発見しました。近代病理学は Virchow から始まりました。19世紀のことです。“omnis cellula e cellula” という有名な言葉がありますが、病気の根本は細胞にあるというものです。ちょうどその時代に、微生物学の Koch, それから免疫学では Pasteur がそれぞれの学問を発展させました。現在は実験病理学、分子病理学であり、分子を中心に発症機序を考えようとしています。

また後でお話しますが、ここで知っていただきたいのは、Malpighi が赤血球、毛細血

管を見つけたのと顕微鏡が発明された時期とちょうど一致します。さらに、Virchow, Koch, Pasteur らがそれぞれの分野で金字塔を打ち立てたのですが、その頃には大変よく見える、現代の顕微鏡に近いものが製作されるようになっていた。その顕微鏡の発達に貢献したのが Abbe (1840年~1905年) です。ですからこういう医学・生物学の進歩のインフラとして顕微鏡があったというのは非常に本質的な話ではないか、と思います。

翻って私たちの大学を見ますと、1901年に本学病理学教室ができたときの教授(当時は教諭)が角田隆先生です。学生諸君は実習室に入って左側に角田先生の胸像を見たことがあると思います。図3上は当時の病理学教室です。角田先生は「病理組織学」を上梓しておられ、図3下は結核結節のマイクロ像ですが、非常に精細に画かれています。まだまだマクロが盛んであった時代にマイクロを示され、この重要性を教えられたのではないかと想像されます。

私の先代教授は藤田哲也先生(在任1967年~1995年)です(図4)。皆さんは神経発生におけるマトリックス細胞説をご存知かと思いますが、藤田先生はその説を当時最新のオートラジオグラフィを使って打ち立てられました。トリチウムチミジン ( $^3\text{H}$ -thymidine) を投与しま



図3



藤田哲也先生(在任1967-1995)

形態学に時間軸を入れた

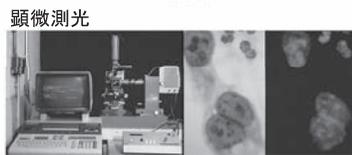
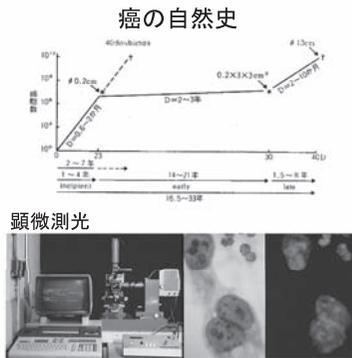
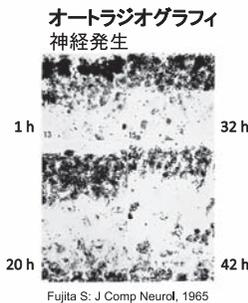


図4

すと、DNA合成をしているS期の細胞だけに取り込まれ、写真で現像したのと同じように黒い点となって現れます。図は連続標識法といって、ある一定の時間の間<sup>3</sup>H-thymidineを連続投与して、この間にS期を通過した細胞を標識する方法です。この方法を用いて、発生初期の神経管がマトリックス細胞という種類の多分化能幹細胞から構成されていることをお示しになりました。また、この手法を癌の生長の研究に応用して、generation timeとdoubling timeに大きな開きがある時期がある、つまり癌がほとんど大きくならない時期があることを示されました。それから図4右下は顕微測光法ですが、DNA量が場合によっては受精卵が持つDNA量の倍数性や異数性を示すことができますが、その核一つ一つのDNA量が分かる方法です。このように藤田先生は、目の前の固定された細胞が過去にどのような増殖を示したかの情報を引き出された、つまり一言でいうと、「形態学に時間軸を入れた」こととなります。これは非常に大きなお仕事であったと思います。

### 顕微測光から共焦点顕微鏡

次に顕微測光から共焦点顕微鏡についてお話をします。私の研究歴の中で取り組んできた、ないしは取り入れた方法論は、最初に顕微測光、その後デジタル画像処理、共焦点顕微鏡、細胞内カルシウムイメージング、非線形光学顕微鏡、最後にこれらの応用としての医療支援システムです。これらを順にお示ししていきます。顕微測光は微小領域の物質質量、たとえば核DNA量などを測るものです。これを最初に行ったのはCasperssonというスウェーデンの研究者で、吸光度から物質質量を測る吸光測光を行いました。しかし、この方法には大きな間違いを生じる可能性がありました。詳しくはお示しませんが、対象が均質ではない場合や非特異吸収が大きい場合にはとんでもない結果がでてしまいます。それを指摘したのが藤田先生と福田先生なのです。私が大学院生として小児科から病理に来て師事したのが福田先生で、ちょうどこれらの問題を克服するため蛍光測光をス

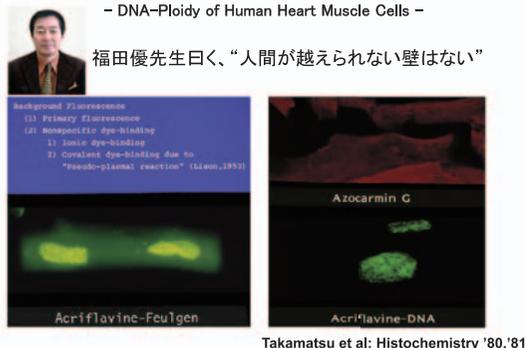
タートされたときでした。

病理に来て心筋細胞の核DNAの蛍光測光をすることになり、教えられた通りに染めたのですが、図5左のような状態でした。核だけを測光したいのですが、バックグラウンドが強く光っていてとても正確には測れません。裸核にすれば測れるのですが、そうするとその核は心筋細胞の核なのか間質細胞の核なのかが分からなくなります。それまでドイツのグループが心筋細胞のDNA量(DNA ploidy)を報告していましたが、結構いい加減なことをやっているなと思いました。そしてここから1年半以上苦勞しました。福田先生はエネルギーかつパワフルな方で、「人間が越えられない壁はない」、と常に声をかけていただきながらその当時蛍光色素と言われるものを殆ど試し、ようやくこのazocarmine Gというものがバックグラウンドを落としてくれるということが判りました<sup>12)</sup>(図5右)。この時の苦勞が後で役に立ちました。

この方法で測ってみますときれいなデータが出ました(図6)。乳児期まではほとんどが受精卵と同じ2CのDNA量を持つ心筋細胞から成るのですが、次第に4Cなど多倍体が出はじめ、思春期になりますと大人と同じ8Cが出現しますが、以後は変わりません。心肥大や心筋症では16Cや32C、場合によっては64Cも出現することが判りました<sup>3)</sup>。顕微測光では顕微鏡のピンホールの下に核を持って行って測るわけですが、朝から晩まで1組織当たり300~500個の核を測っていました。ただ残念なことに、目で形態情報を捉えているのですが、コンピュータに入力して残すのはDNAの測光値だけです。この捨てている形態情報を残したいと思い、次に始めたのがデジタル画像処理でした。

私がデジタル画像処理を始められたのは、ようやく専門家でなくても使えるコンピュータが揃ってきた時代になっていたからです。ただ私たちが最初の頃に使ったものは、例えばメインメモリーが8Kとか16K、メガとかギガではなくキロでした。この状況で画像処理をしようというわけですからかなり無理がありました。皆さんが現在PCで簡単にできることがなかなか

Cytofluorometry on cells isolated from paraffin sections  
- DNA-Ploidy of Human Heart Muscle Cells -



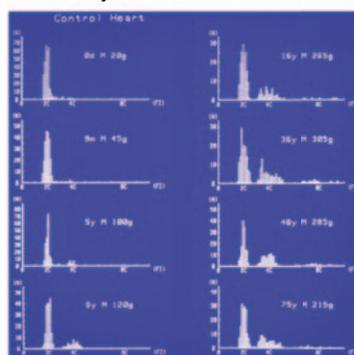
Takamatsu et al: Histochemistry '80, '81

図5

できない時代です。ですからいつ頃研究した成果なのかに注意しておいてください。

この頃、小児科から来た白石先生、現在国立循環器病センターの小児科部長ですが、彼が非常に頑張って良い仕事をしてくれました。何をしたかといいますと、画像処理を使って、ヒトの洞房結節 SA node の大きさとリズムを作る細胞である nodal cell や線維組織を分けて体積を測りました<sup>3)</sup>。トリクロームマッソン染色の画像で青色が線維組織、赤色が nodal cell です。洞房結節の端から端まで連続切片を作りそれぞれの切片上で画像処理を用いて nodal cell と線維組織を測定し、これらを合計して全体の体積を測ったわけです。何故このような研究をしたかといいますと、当時 Sick sinus syndrome で亡くなった症例の洞房結節の切片を数枚だけ見て直ぐ線維化が起きている、つまり実質細胞である nodal cell 数が減少がこの不整脈と考えられていました。この分野で権威の先生がおられて、その先生に標本をみてもらおうとすべて線維化の結果が返ってくる。これはおかしいということで、白石先生に調べてもらいました。彼は大量の連続切片を作ったおかげで、洞房結節がどこにあるか心臓を外から見ただけでもわかるようになりました。その結果、全体の大きさは大きくなります(図8)が、大事なことは、加齢に従って全体の大きさはちょっと小さくなるものの nodal cell は減らないのです。線維化と言っていたのは、線維組織がほかの要素と比較して急

DNA-Ploidy of Human Heart Muscle Cells



Takamatsu et al: Histochemistry '83

図6

激に増えたため、間違っって線維化と診断されていたことがわかりました。この現象はむしろ線維組織が増えることが生理的であって、小児に比べて成人では上室性の不整脈や SA node に関係したような障害が起りにくい状態を作り出しているのではないかと、これまでと逆の話になったわけです。この論文は教科書的事実として今でも引用されています。

こういう仕事では画像処理は実に役に立ちました。ただ、連続切片を作成しなければならないことや二値化処理に限界を感じていました頃、共焦点顕微鏡の研究を始めていました。共焦点顕微鏡を最初に考案したのは Minsky という人工知能で有名なアメリカ人です。彼が若い頃 1957 年に特許を取っていますが、その時代には残念ながらコンピュータも光学系もまだまだのためアイデアで終わりました。1980 年代に入ると世界各国で競争的に開発が行われるようになりましたが、日本では私たちが最初に発表しました<sup>4)</sup>。1988 年のことです。苦労話はさておき、図9は最初に共焦点像がとれた私たちの共焦点レーザ走査顕微鏡 (LSM-G) です。同時に阪大の応用物理の河田聡先生たちとレーザ顕微鏡研究会を立ち上げ、日本の光学顕微鏡の先進的な仕事がこの会でなされました。

### 不整脈原性基質

共焦点顕微鏡の論文を投稿してから、1987 年私はアメリカに留学しました。それは心臓を研

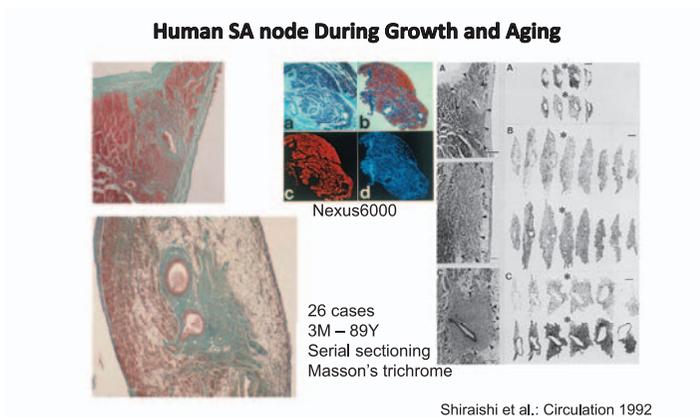


図 7

### Human SA node During Growth and Aging

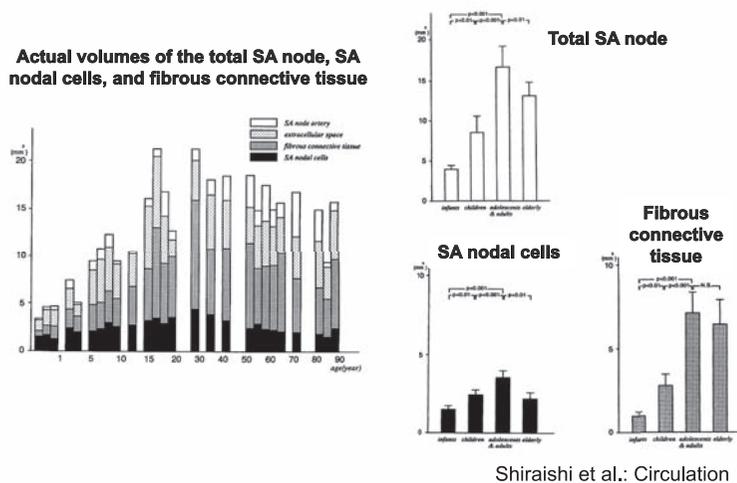
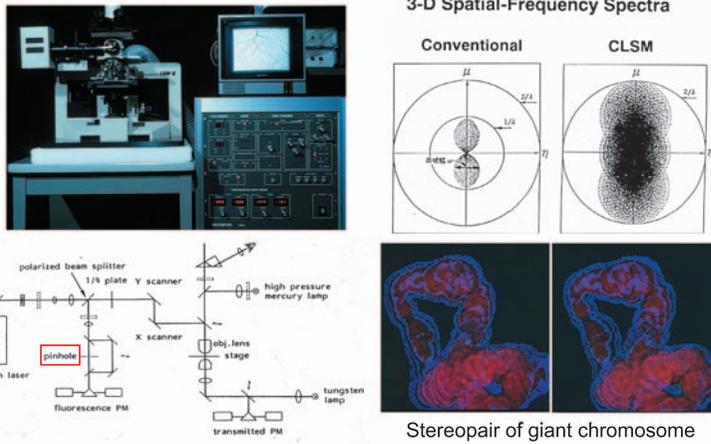


図 8

究するのには、先ほどの白石先生の仕事もあったのですが、生きた細胞を使わないと何もわからない、固定標本で心臓の研究をするのは間違っているのではないかと考えたからです。藤田先生から生きた細胞を勉強する許可を頂き、行った先はメリーランド州立大学の生理学教室です。私が一緒に仕事をしたのが Winthrow Gil Wier 先生ですが、その当時この教室はカルシウムイメージングのメッカのような所で、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger で有名な Mordecai P.

Blaustein 先生が主任教授でした。図 10 が私の作り上げた顕微鏡なのですが、共焦点ではなく普通のビデオマイクロスコープです。速いスピードでイメージングするには励起を切り換えていたのではダメだということで、カルシウムの指示薬は 1 波長励起 2 波長蛍光の indo-1 を使うため、カメラが 2 個ついています。これでビデオレートの倍のスピード 17 ミリ秒に 1 枚撮れました。これで図 10 左下に示すようなカルシウムウェーブが伝わっていくところが見えまし

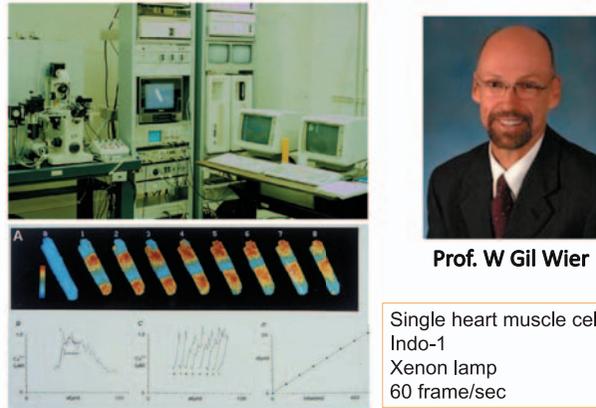
### 共焦点レーザ走査型顕微鏡 LSM-G



Stereopair of giant chromosome  
Takamatsu & Fujita: J Microsc '88

図 9

### Ca<sup>2+</sup> Imaging with Video Microscopy



Takamatsu & Wier: Cell Calcium, FASEB J '90

図 10

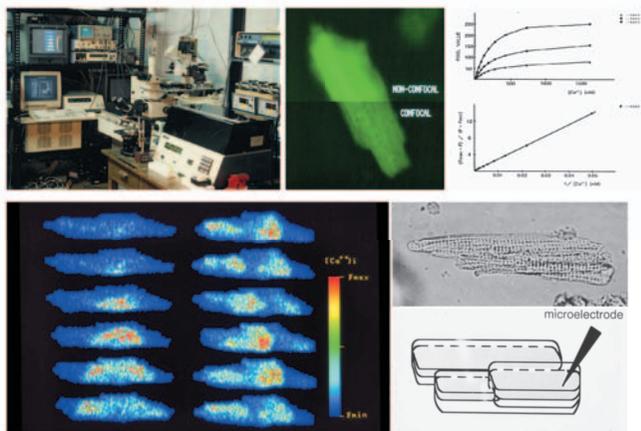
た<sup>5)6)</sup>。ここでC言語を勉強させていただきました。

帰国して直ぐ生きた細胞の共焦点像を取ろうとして作ったのが倒立型共焦点顕微鏡システムです(図11)。たとえば図11下左にカルシウムイメージを示す単離心筋細胞群を模式図で示すと3つの細胞からなっています。非常によかったのは、このように重なった細胞群のカルシウ

ム動態はこれまで捉えることができなかったのですが、共焦点を使うと撮れたのです。つまりカルシウムウェーブが細胞間をこのように出て拡がることを非常に簡単に示すことができました。生きた心筋細胞(群)でこういう画像が撮れたのはこれが世界最初です<sup>7)</sup>。1991年です。

そもそも私がやりたかったのは、心筋梗塞における致死性不整脈の発生機序の研究でした。

### 共焦点顕微鏡による $[Ca^{2+}]_i$ の測定



Takamatsu & Fujita: Cell Struct Funct 1991

図 11

中でも心室細動（図 12）ですが、このように心室細動が始まり治療しないと心臓はポンプとしての機能が全くできなくなります。この心室細動の発生機序が判っていないのです。不整脈の世界というのは歴史的に薬が先で、薬が効くからその発生機序はあまり研究されてこなかった、つまり心筋細胞レベルで何が起きているのか分かっていませんでした。確かなのは梗塞巣の近傍に残存した心筋組織から発生するという事です。不整脈研究が特殊なのは、異常な細胞群で生成された異常な刺激が正常な心筋群の異常として伝わる、つまり小さな微小領域の異常が心臓全体の異常になることです。不整脈を解明するには微小領域から心臓全体のマクロまでを観察しなければなりません。私はここに共焦点顕微鏡が使えるかもしれないと考えました。一つの単離心筋細胞を微小電極で制御するこれまでの方法は細胞下レベルの研究に向いていますが、不整脈の研究には器官として心臓を認識する必要があります。その理由は、器官内には細胞間コミュニケーションや伝導系があるからです。また、心筋梗塞は血管の疾患です。細胞間コミュニケーションや血管がない単離した心筋細胞では不整脈を理解できないと考えました（図 13）。

### 心筋梗塞による致死性不整脈

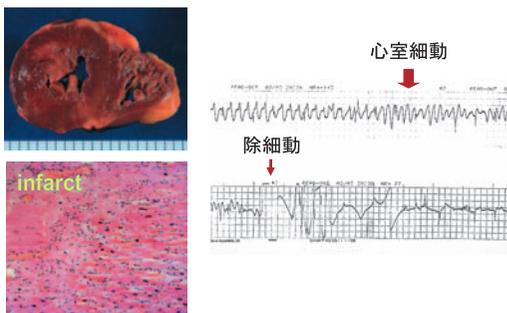


図 12

### Imaging of Live Cells

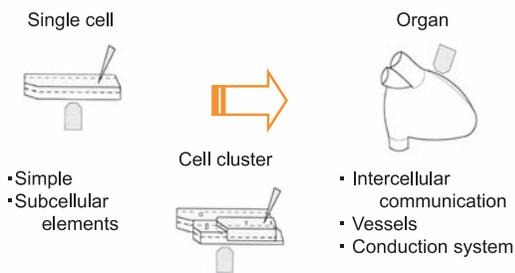


図 13

そこで共焦点顕微鏡によって光学的な断層像が撮れるのであれば、まるごとの心臓に対物レンズを当てて細胞を観察できないかと作った共焦点顕微鏡システムが図 14 です<sup>11)12)15)</sup>。まるごとの心臓をランゲンドルフ灌流しておいて、もちろん心電図も取れますが、レンズを心臓表面に当てて画像を撮りました。私たちは高速(ミリ秒レベル)で撮像しなかったので、この共焦点顕微鏡では走査系にガルバノメータミラーの代わりに数多くのレンズ付きピンホールが置かれたニポウデスクが回転する方式を利用しました。これが正常の心臓を撮ったものです。青いのはカルシウム濃度が低いことを表していますが、全体が一様に明るくなって元へもどる。これが心電図に一致しています。この方法で心臓の中で生じるカルシウムウェーブを捉えて 2000 年に *Circulation Research* に投稿したところ、有用な新しい方法だということで表紙を飾りました<sup>16)</sup>。

ここから発症機序の話です。心筋細胞に障害が加わると、細胞内カルシウム濃度が高くなり<sup>9)</sup>、カルシウムウェーブが心筋細胞の中で起きます。心筋細胞は正常ですと細胞内カルシウム濃度は細胞外に比べて非常に低いのですが、それが膜電位の変化によってカルシウムが細胞内に入り、筋小胞体のリアノジン受容体を刺激して小胞体の中の高い濃度のカルシウムが細胞質に出ます。この濃度の高いカルシウムによってミオフィラメントが収縮した後、このカルシ

ウムは SERCA によって小胞体に取り込まれたり、細胞外へ汲み出されたりするわけですが、その時働いているものに  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchanger があります(図 15)。これは細胞内のカルシウム濃度が高くなりますと、 $\text{Na}^+$  との入れ替えで  $\text{Ca}^{2+}$  を外へ出します。ただこのとき  $\text{Ca}^{2+}$  1 分子に対して  $\text{Na}^+$  3 分子が入るため、1 つ差ができて異常な電流が生じる可能性があります。この異常電流が不整脈に結びつくのではないかと考えました。

そこで私たちは先ほどの共焦点顕微鏡を少し改造しまして、アルゴンクリプトンレーザで励起して、チャンネル 1 は fluo4 でカルシウムを、チャンネル 2 は RH237、これは膜電位に感受性のある蛍光プローブですが、それぞれを 1 つのセンサの半分ずつに入力してやることによってカルシウム濃度と膜電位とを精確に同時測定することができるようにしました(図 16)。この方法を使って正常心臓を測定すると膜電位が変化してその後カルシウム濃度が上昇します。これが正常です。ではカルシウムウェーブはどうか。単離心筋でも同じくカルシウムトランジェントが起きた時膜電位はちょっと動いている。これはうまくいきそうだということで心臓内の心筋細胞でやってみると、カルシウムウェーブが起きてても全然膜電位は動かないのです。考えてみますとこれは当然で、一つのカルシウムウェーブで生まれる起電力は非常に小さいので、ギャップ結合で電氣的に繋がった周りの細

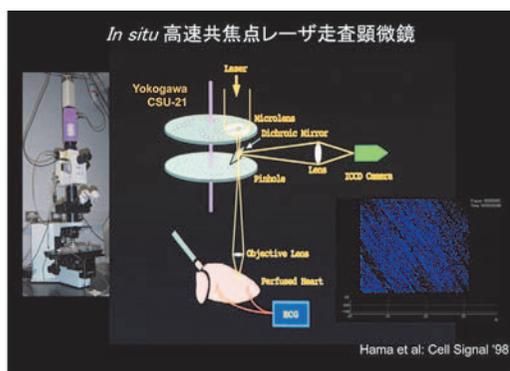


図 14

カルシウム波は不整脈原性の膜電位オシレーションを起こすか

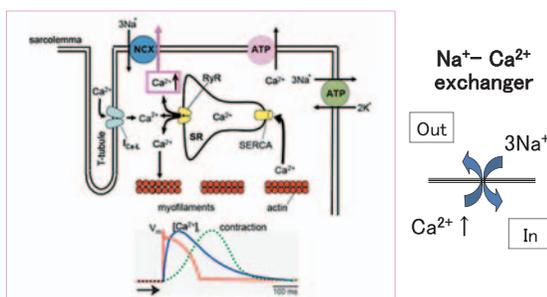


図 15

胞に電流は拡散してしまうためと思われます。私たちの心臓というのは心筋細胞に障害が起きて、たとえカルシウムウェーブが生じても少数であれば、周囲に影響しない仕掛けになっているのです。これに対してバースト状のカルシウムウェーブは起電力が大きくなる場合があり、カルシウム濃度の変化に伴って膜電位が変化していました(図17)。このようにバースト状のカルシウムウェーブが起きると膜電位の変化(triggered activity)を引き起こし不整脈原性になるということを報告しました<sup>18)21)</sup>。この仕事は2008年のCirculation Researchの表紙を飾るとともに、教科書であるBraunwald's Heart Diseaseの不整脈の項に大きく採り上げられま

した。機能病理をやってよかったと強く感じた研究です。

今度は心筋細胞が死んでいくときの話です。心筋梗塞後5日から1週間ぐらいで梗塞巣周囲のギャップ結合のリモデリングが起きます(図18)<sup>10)13)14)</sup>。このリモデリングは一様ではなく不均一に起きている可能性があります。例えば、培養した心筋細胞に心筋細胞間ギャップ結合の主たる構成タンパクであるコネキシン43のドミナントネガティブ阻害を起こすと、図19のような伝導の異常が起きます。これを詳しく調べますと伝導していない中心の部分はmRFPの発現からドミナントネガティブ阻害が強いことが判ります<sup>17)22)</sup>。同じ現象が私たちの心臓の中で

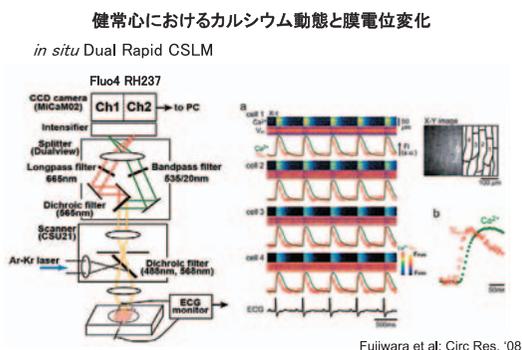


図 16

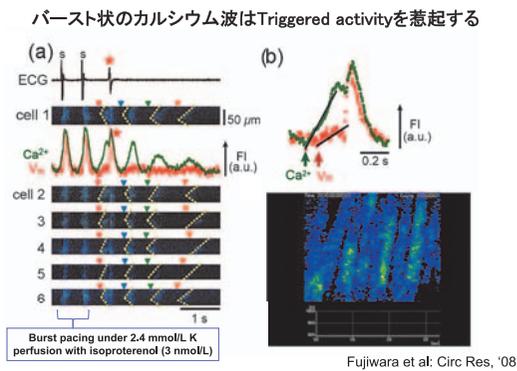


図 17

### 心筋梗塞境界部のギャップ結合リモデリング

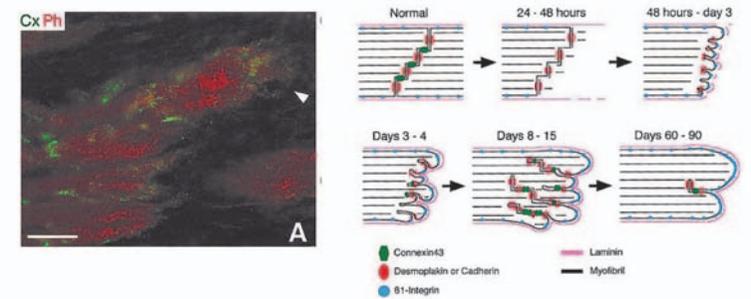
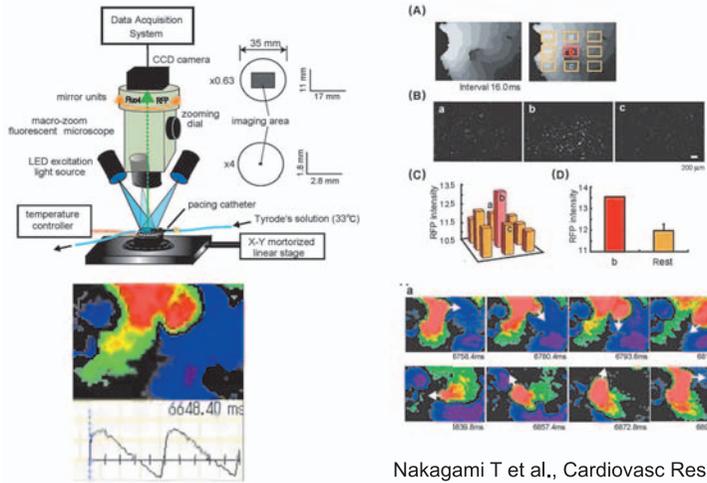


図 18

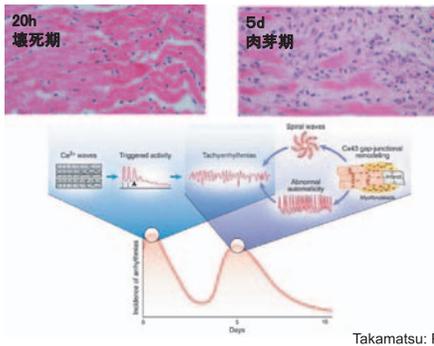
コネキシン43ドミナントネガティブ阻害は不整脈を惹起する



Nakagami T et al., Cardiovasc Res 2008

図 19

心筋梗塞における致死性不整脈の発症機序



Takamatsu: Pathol Int '08

図 20

起きると、ローターのような異常伝導が起き、これが心室細動を起こす可能性があるのです。今日は一部しかお話できませんが、梗塞の壊死期と肉芽期とでは発症機序が異なっており、最初お話した triggered activity を引き起こすバースト状のカルシウムウェーブは壊死期、コネキシン 43 のリモデリングは肉芽期での主たる発症機序ではないかと私たちは考えています (図 20)。

田中先生たちがやってくれている最近のデータですが、膜電位の変化をよく見ていただくと、先ほどと同じように、マウスの心房で膜電

位がぐるぐる回っていることが分かります。マウスの心房にはこういう現象を起こしやすい組織構造がもともとあるのだということを Heart Rhythm に発表しました<sup>32)</sup> (図 21)。ヒトでも肺静脈—左心房接合部から心房細動が起きやすいので、接合部を組織学的に調べてみると心筋の量やギャップ結合の分布に特徴をもった不整脈原性基質を形成している可能性があります。

医療支援システム

次に医療支援システムの話をしていきます。みなさんよくご存じですが、10 年後には 3 人に 1 人が 65 歳以上の高齢者です。このような少子高齢化が進んだ社会であり、また以前は治るだけで満足したのが最近では元通りにしてほしいなど、国民の医療に対する強い要求があります。このため私たちがしなければならない医療技術の開発は、個別化医療と低侵襲で効率のよい安価な医療です。これらの要求に、私たちがこれまで研究してきた光を使った技術がよく合っています。光学顕微鏡が光の世界では非常に進んでいる分野ですので、その光の技術を医療機器にもって来れば必ず社会に貢献できるのではないかと私は考えています。

日本でもぼちぼち始まっていますが、欧米では画像ナビゲーション手術が行われています。イメージガイド下の手術という意味ですが、たとえば副鼻腔を介した脳底部の手術では、内視鏡の先がCTから作成された3次元像の中に投影されます。このように複雑で重要な組織がたくさんあるところではナビゲーション手術が必要になります。またイメージをガイドに脳腫瘍をより精確に取り除くことができます。ただ、今イメージとしているのはCTかMRIですが、それに私たちは蛍光やラマン散乱光を使ったイメージング、あるいは多光子励起による分子標的の不活化<sup>19)</sup>を利用した手術が出来ないか考えています。

図22は大腸内視鏡の白色光像です。左側の腫瘍は明らかですが、右側は多分専門家でないとわかりにくい腫瘍です。左側が判りやすいのは色と形が周囲と違うからです。色と形が周囲とさほど変化がない早期の腫瘍は判り難いのです。これをわかるようにするためには分子イメージングが必要になるわけです。何故光をイメージガイド手術に使うかといいますと、光というのは分子イメージングが非常に得意だからです。これに対してCT/MRIや超音波は不得意です。

5ALAを用いたセンチネルリンパ節転移検出の話をしてします。腫瘍がリンパ節に転移するときセンチネルリンパ節が大事だということはみなさんご存知だと思いますが、現在は病理に提出して凍結標本を作製し病理医が顕微鏡で癌があるかないかを判断します。ところがこのセンチネルリンパ節の迅速診断は約30分かかります。現在、もう一つの方法としてOSNA法があり、組織を可溶処理してその後遺伝子増幅するのですが、それによって上皮細胞の遺伝子がリンパ節にあれば転移ありとします。これも30分以上かかります。その間待つ必要があります。術者、患者ともに大きな負担になっています。私たちのアイデアは5ALAを利用してリンパ節転移を短時間(3分以内)で検出することです。5ALAは代謝されてヘムとなり赤血球に使われますが、多くの癌ではferrochelataseの活性が低下

しており、プロトポルフィリンIX(Pp IX)が細胞内に蓄積してきます(図23)。術直前に内服していただくことによってより多くのPp IXが細胞内に蓄積し、コントラストを上げることができます。青い光を当てるとPp IXは赤い蛍光を発しますので、この赤い蛍光を指標に癌の存在を知ることができます<sup>27)33)</sup>。

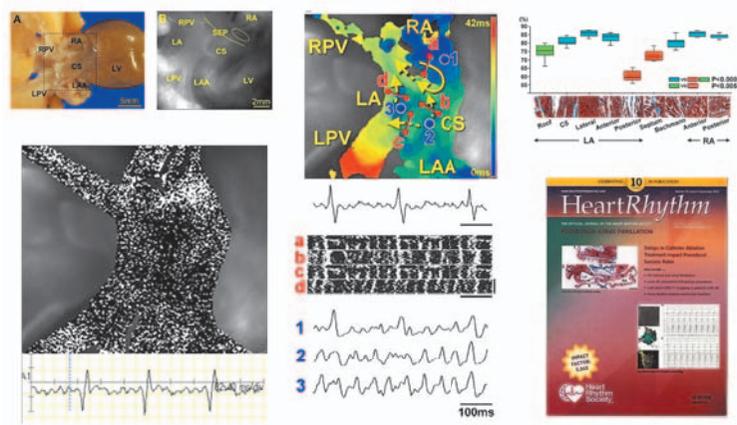
現在までに多くの症例で確かめました。例えば大腸癌の原発巣を白色光から蛍光観察に換えると、癌の範囲が赤く光り明確に判ります。リンパ節も蛍光にするとこのように光ります(図24)。手術の前に5ALAを飲んでおいてもらうだけで癌のあるところが光るわけです。今やろうとしているのはリンパ節を取り出して検出装置にかけると3分以内に判断がつくというものです。これは切除断端にも使えそうなので、今後やっていきたいと思っています。今、国のプロジェクト研究でやっていますが、もうしばらくしたら多くの施設に提供できるようになると思われます。

光を医療で使う場合2つの問題点があります。それは5ALAのようにプローブとして使えるものは現在殆どなく、自家蛍光を利用する<sup>29)35)</sup>以外にはICG(indocyanine green)ぐらしかありません。私のアイデアはプローブを使わずに、ラマン散乱光を用いて分子イメージングができないかというものです(図25)。もう一つの問題は、組織の深部に光が届かないことです。これに対して私たちは光音響<sup>28)37)</sup>を研究していますが、今日は時間がないので割愛させていただきます。

振動数が一定のレーザ光を分子に当てますと、この分子の特異的な振動によってエネルギーが加わったり取られたりして、少し振動数の変わった散乱光が出てきます。これがラマン散乱光です(図25)。振動数が少し落ちたものをストークスラマンと呼び、これを精密な分光器で測ると、得られたスペクトルから分子を特定することができます。つまり無染色で生きたまま分子イメージングが可能になるわけです。

この方法を先ず心臓に使ってみました。陳旧性の心筋梗塞の外科手術は、心筋バイアピリ

### 心房細動の内在性発生基質



Matsuyama T et al., Heart Rhythm 2013

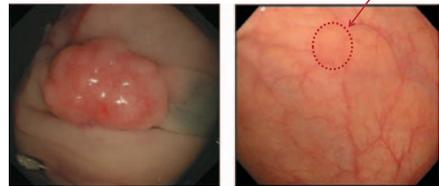
図 21

ティがある場合冠動脈のバイパス手術をします。バイアビリティがなければ、冠動脈のバイパス手術プラス左室形成術をします。このバイアビリティを現在はガドリニウム遅延造影MRIで評価していますが、大がかりで手術室での利用が困難なために開胸したときに心臓を見ながら観察することはできません。また心臓の患者さんに多いペースメーカーを装着した患者さんには使えないというような問題があります。開心術のとき光を当てたらそのバイアビ

### 大腸内視鏡

白色光イメージ

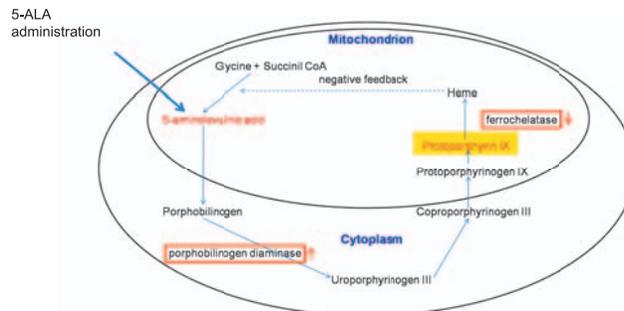
大腸腺腫



分子イメージングが必要

図 22

### 5-aminolevulinic acid (5-ALA)の代謝



癌細胞は、porphyrinogen diaminase(PBG)活性が高く、ferrochelatase(FC)活性が低いいため、protoporphyrinIXが増加し、蛍光を発する。

図 23

## 5-ALAを用いたリンパ節転移診断

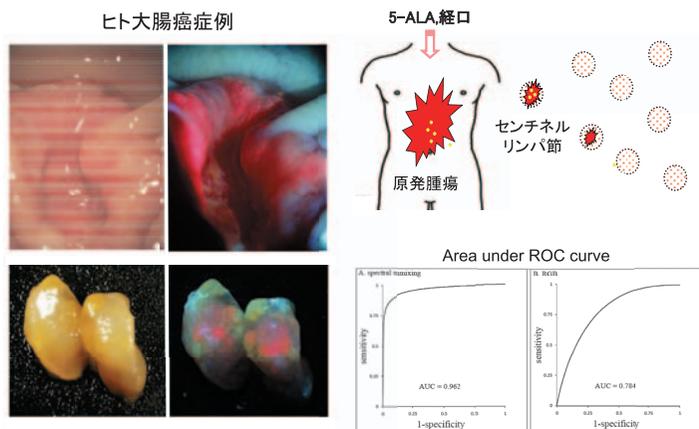


図 24

リテイが分かるようにしたいのです。図 26 がその可能性について調べたものですが、生きている心筋細胞と死んで線維化を起こしている組織がラマン散乱を使うことによって明確に分けることができました。詳細に検討しますと、生きている心筋には cytochrome, 線維化のところは collagen type 1 のラマンスペクトルが特徴的であることが分かりました<sup>25)</sup>。

最近のデータですが、新しい壊死組織 (赤), 肉芽組織 (緑), 残存している心筋組織 (青) を区別することもできました<sup>36)</sup> (図 27)。丸ごとの心臓からもスペクトルを捉えることが可能ですので、これを早くヒトの心臓の観察へもっていきたいと思っています。色々問題がまだまだありますが。

次はラマン散乱による末梢神経の検出です。例えば前立腺癌を摘出するとき、癌が外に浸潤している可能性があるため、なるべく大きく摘出したい。ところが前立腺は膀胱の直ぐ下にあるので、非常にたくさんの神経が走っています。Neurovascular bundle が目印になっていますが、これを傷つけると排尿障害が起こります。男性ですのでインポテンツにもなります。また強い障害では排便障害も起こり QOL が悪くなります。電気刺激は自律神経には利用できませんので、現在は術者の眼、経験に頼ってい

ます。光を当てて神経の検出ができないか、これをラマン散乱でみてやろうというわけです。凍結切片で確かめてみると、神経を周りの組織から見分けることができました。ヒトでも同じように切片ですが見分けることができました (図 28)。最近、ラットの神経を *in vivo* で検出することもできるようになりました<sup>39)</sup> (図 29) ので、今これを手術室で使えるようにしているところです。

### Non-junctional Cx43

最後に、コネキシン 43 に関する最近の話題です。もともとコネキシン 43 は先程お話したようにギャップ結合を構成する蛋白質として知られていました。ところが色々調べてみると、コネキシン 43 が核の中へ入って行ったりする。どうやらコネキシン 43 が細胞の増殖や分化に関係していそうだと、ということに気が付き、調べてみると、コネキシン 43 が TGF $\beta$  のシグナリングに関係することが分かりました<sup>20)24)</sup>。

例えば、角膜の内側の内皮に 30G の針で傷つけ、治癒の速さを前眼房水の中に siRNA を入れ Cx43 を抑制したものと抑制しないもので 3 日後に比較してみますと、siRNA を入れない場合治癒は不完全ですが、入れると完全に内皮によって被われていました<sup>23)</sup> (図 30)。

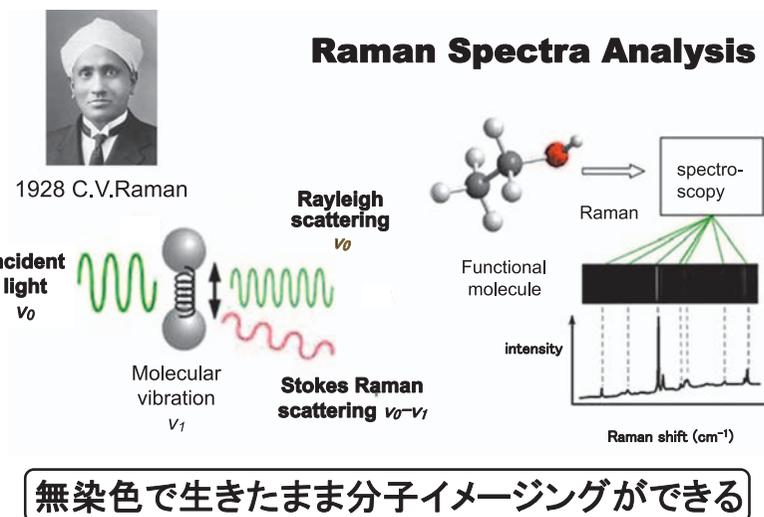


図 25

**Raman Spectra of Cardiomyocyte and Fibrous Tissue Myocardial Infarct (Day28)**

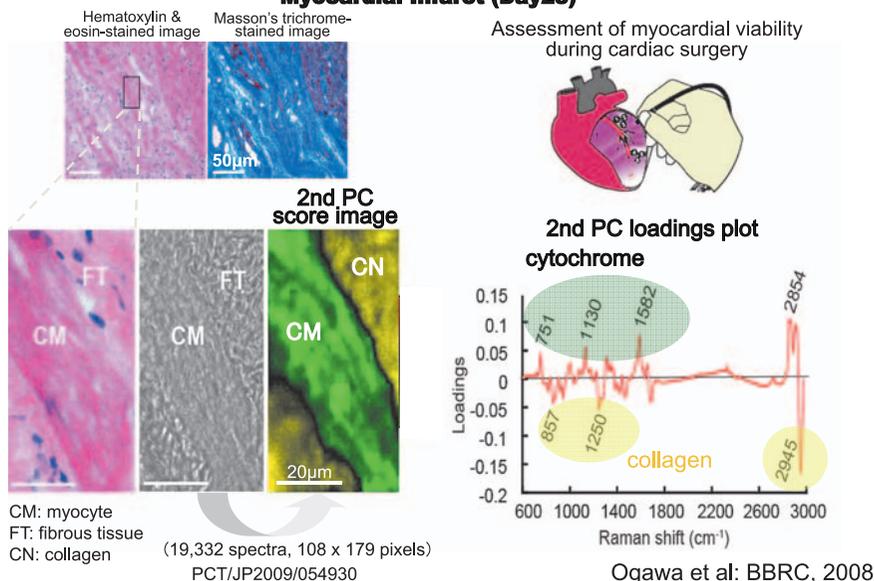


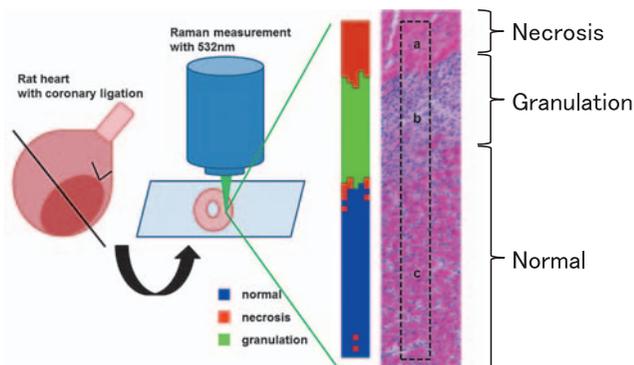
図 26

このギャップ結合構成タンパクとしてではないコネキシン 43 の機能にどの分子が関わっているのか、釣り上げて調べてみますと Heat Shock Cognate Protein70 (HSC70) が見つかりました<sup>30)38)</sup>。コネキシン 43 とサイクリン D1 が HSC70 と結合するところで競合していて、コネ

キシ 43 が多くなると、サイクリン D1 の作用が弱くなるということです。

さらに最近ですが、去年の11月に同じくコネキシン 43 のサイレンシングと TGF $\beta$  のインヒビターを入れてやることで iPS 細胞ができました<sup>34)</sup>。これは今後再生医療に関係する仕事にな

## Two-dimensional image at the border area Day 5 after ligation

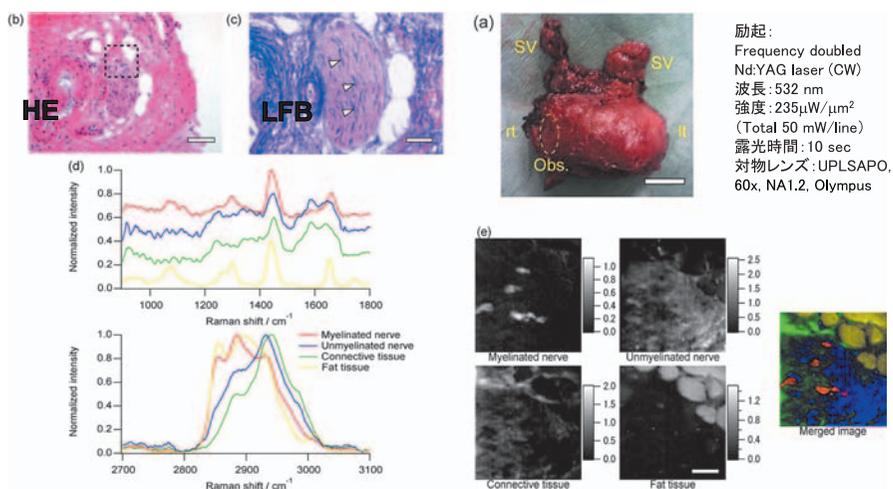


partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA)

Muranishi et al. Anal Chem 2014

図 27

## ヒト前立腺周囲の末梢神経検出



無髄神経を含む末梢神経をラマン光により鑑別可能(特願2012-79742)

図 28

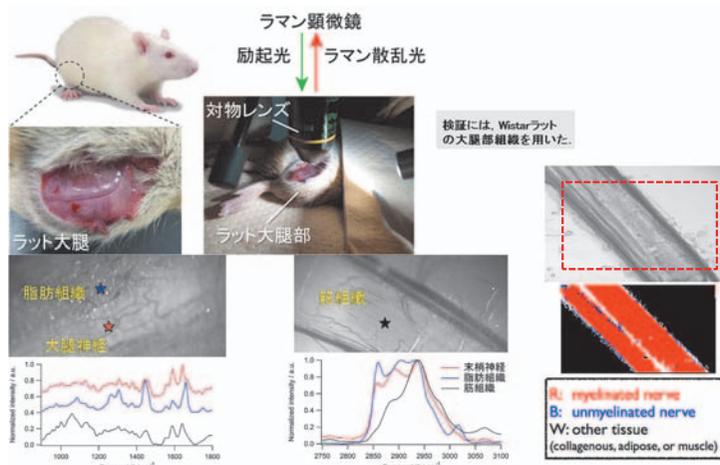
ると思います。

### おわりに—機能と形態との融合—

さて、顕微鏡の歴史と医学生物学における色々なイベントを並べてみますと、顕微鏡の進歩と生物学の新たな発見は対になっているよ

うに思えます。顕微鏡が発明されたのが16世紀の終わりから17世紀ですが、現在の光学顕微鏡はAbbe, Zeiss, Kohlerが出てからです。この時期と一致して医学生物学でKochやPasteur, さらにVirchowが活躍しました。最近ではMinskyが考案した共焦点顕微鏡の実現化

### ラマン散乱による末梢神経の *ex vivo* 検出



Minamikawa et al: Sci Rep, 2015

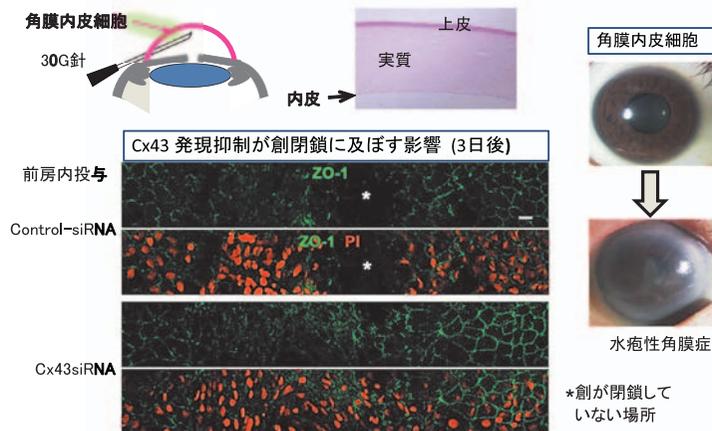
図 29

や多光子顕微鏡の発明と下村脩・Roger Tien の GFP が関連します。また 2014 年は Stephan Hell とか Eric Betzig が超解像度顕微鏡でノーベル賞を受賞しましたが、生物学的には今後この超解像顕微鏡によってどのような発見がなされるのか楽しみです。

さて、私は形態と機能を併せようという仕事をやってきたのですが、どんどん解像度を上げ

ていくとこれは分子の動きを見ているということになり、このことは形態の中で機能を見ているということになるわけです。顕微鏡が発達して、形態と機能が融合していく。蛋白一つ一つの動態が生きた臓器の中で見えるようになれば革命的な話になると思います。それからもう一つ、超解像、ナノスコープからマクロまでの間をシームレスに見える顕微鏡というのが今後必

### Connexin43 Knockdown Accelerates Wound Healing but Inhibits Mesenchymal Transition after Corneal Endothelial Injury In Vivo



Nakano et al: Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008

図 30

要です。ということで機能病理学とか形態病理学とか言っても、もう時代遅れになってきた感があります。

学生諸君への“take-home message”です(図31)。疑問に思ったことは自分でやってみてください。学説というのは、今日のnodeで話したように間違っていることもあります。もし方法や調べる機器がなければ自分で作る、自分の実験系が動いていると新しい実験系に変更するのはなかなか勇気がいるのですが、その勇気が持てるか持てないか、であります。もう一つ、学生諸君は診断基準やガイドラインを鵜呑みにしない。最近、皆覚えてしまう、鵜呑みにしている人が多いように思います。概念、考え方、本質というものをしっかり掴んでいないと、これらをいくら覚えても3年後には変わっているかもしれません。府立医大の学生諸君ならできるはずです。

最後に、私の教室に所属した共同研究者の方を挙げさせてもらいます(図32)。一緒に研究して学位をとった人が約50名います。その人たちの力をお借りして、私は後ろから補助をするような形で今日お話ししてきたような仕事ができるのだらうと思います。

永い間有難うございました。

著者は、ウシオ電機(株)より研究費を受領している。

### 学生諸君へ

疑問に思ったことは自分でやってみる。方法がなければ自分で作る。

診断基準やガイドラインを鵜呑みにしない。その概念を知ることが大事。

図31

### 細胞分子機能病理学(第二病理)に所属した共同研究者

藤田哲也、福田 優

浅妻(中村)右子  
足達哲也  
池辺均  
伊藤良治  
井上香織  
今泉克一  
入江彰一  
岩上直嗣  
太田泰輔  
大平卓  
小川貢  
小山田正人  
小山田ゆみ子  
岡田晃一  
加藤祥行  
桂奏  
金子智行  
河内秀幸  
倉田博之

小泉範明  
越野勝博  
小西英一  
白石公  
鈴木敏弘  
鈴木智之  
姜艶  
周武雄  
大東淳子  
高橋章之  
高橋(松原)麻矢子  
竹田昂司  
戴平  
田中秀央  
田邊卓爾  
谷口大吾  
辻井英治  
姚曉虹  
長岡孝則

中上拓男  
中條卓也  
中野圭明  
中野由起子  
橋本恵美  
畑佳伸  
畠山知也  
濱岡(岡本)亜希子  
濱雄光  
浜本徹  
原田憲一  
原田義規  
人見敏明  
日野仁嗣  
平川永徳  
藤井麻衣子  
藤田克昌  
藤原克次  
古田博一

細川洋平  
米花正智  
真崎武  
増田淳司  
増田慎介  
松尾久敬  
松下努  
松波達也  
松山高明  
万井弘基  
南川丈夫  
南川哲寛  
三宅敏彦  
宮脇喜一郎  
村西菜苗  
村山康利  
安井寛  
山岡禎久  
山元康敏  
横山慶一

図32

### 文 献

1) Takamatsu T, Nakanishi K, Onouchi Z, Fukuda M, Fujita S. Nonspecific (“pseudo-plasmal”) dye-binding

in the Feulgen nuclear stain and its blocking by azocarmin G. Histochemistry 1980; 66: 169-180.

- 2) Takamatsu T, Nakanishi K, Fukuda M, Fujita S. Cytofluorometry on cells isolated from paraffin sections after blocking of the background fluorescence by azocarmine G. *Histochemistry* 1981; 71: 2143-2146.
- 3) Takamatsu T, Nakanishi K, Fukuda M, Fujita S. Cytofluorometric nuclear DNA -determinations in infant, adolescent, adult and aging human hearts. *Histochemistry* 1983; 77: 485-494.
- 4) Takamatsu T, Fujita S. Microscopic tomography by laser scanning microscopy and its three-dimensional reconstruction. *J Microsc* 1988; 149:167-174.
- 5) Takamatsu T, Wier W.G. Calcium waves in mammalian heart: quantification of origin, magnitude waveform, and velocity. *FASEB J*, 1990; 4: 1519-1525.
- 6) Takamatsu T, Wier W.G. High temporal resolution video imaging of intracellular calcium. *Cell Calc* 1990; 11(2, 3): 111-120.
- 7) Takamatsu T, Minamikawa T, Kawachi H, Fujita S. Imaging of calcium wave propagation in guinea-pig ventricular cell pairs by confocal laser scanning microscopy. *Cell Struct Func* 1991; 16: 341-346.
- 8) Shiraishi I, Minamikawa T, Takamatsu T, Onouchi Z, Fujita S. Quantitative histological analysis of the human sinoatrial node during growth and aging. *Circulation* 1992; 85: 2176-2184.
- 9) Takahashi A, Takamatsu T. Effects of basal  $[Ca^{2+}]_i$  on calcium handling in  $Ca^{2+}$ -overloaded rat cultured heart muscle cells. *Cell Signal* 1997; 9: 617-625.
- 10) Matsushita T, Takamatsu T. Ischemia-Induced temporal expression of connexin 43 in rat heart. *Virchow Archiv* 1997; 431: 453-458.
- 11) Hama T, Takahashi A, Ichihara A, Takamatsu T. Real-time in situ confocal imaging of calcium wave in the perfused whole heart of rats. *Cell Signal* 1998; 10: 331-337.
- 12) Fujita K, Nakamura O, Kaneko T, Kawata S, Oyamada M, Takamatsu T. Real-time imaging of two-photon-induced fluorescence with a microlens- array scanner and a regenerative amplifier. *J Microsc* 1999; 194(2-3): 528-531.
- 13) Matshusita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yaduda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 1999; 100(19 Suppl): 11262-11268.
- 14) Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. *Circ Res* 1999; 85: 1046-1055.
- 15) Fujita K, Nakamura O, Kaneko T, Oyamada M, Takamatsu T, Kawata S. Confocal multipoint multiphoton excitation microscope with microlens and pinhole arrays. *Opt Comm* 2000; 174(2-3): 7-12.
- 16) Kaneko T, Tanaka H, Oyamada M, Kawata S, Takamatsu T. Three distinct types of  $Ca^{2+}$  waves in Langendorff-perfused rat heart revealed by real-time confocal microscopy. *Circ Res* 2000; 86(10): 1093-1099.
- 17) Oyamada Y, Zhou W, Oyamada H, Takamatsu T, Oyamada M. Dominant-negative connexin43-EGFP inhibits calcium-transient synchronization of primary neonatal rat cardiomyocytes. *Exp Cell Res* 2002; 273: 85-94.
- 18) Tanaka H, Oyamada M, Tsujii E, Nakajo T, Takamatsu T. Excitation-dependent intracellular  $Ca^{2+}$  waves at the border zone of the cryo-injured rat heart revealed by real-time confocal microscopy. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1501-1512.
- 19) Tanabe T, Oyamada M, Fujita K, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein. *Nat Methods* 2005; 2: 503-505.
- 20) Dai P, Nakagami T, Tanaka H, Hitomi T, Takamatsu T. Cx43 mediates TGF- $\beta$  signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 2264-2273.
- 21) Fujiwara K, Tanaka H, Fujiwara K, Tanaka H, Mani H, Nakagami T, Takamatsu T. Burst emergence of intracellular  $Ca^{2+}$  waves evokes arrhythmogenic oscillatory depolarization via the  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchanger: simultaneous confocal recording of membrane potential and intracellular  $Ca^{2+}$  in the heart. *Circ Res* 2008; 103: 509-518.
- 22) Nakagami T, Tanaka H, Dai P, Lin SF, Tanabe T, Mani H, Fujiwara K, Matsubara H, Takamatsu T. Generation of reentrant arrhythmias by dominant-negative inhibition of connexin43 in rat cultured myocyte monolayers. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 70-79.
- 23) Nakano Y, Oyamada M, Dai P, Nakagami T, Kinoshita S, Takamatsu T. Connexin43 knockdown accelerates wound healing but inhibits mesenchymal transition after corneal endothelial injury in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 93-104.

- 24) Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res* 2009; 315: 1190-1199.
- 25) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 370-374.
- 26) Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Ogawa M, Tanaka H, Nosaka K, Akaji K, Takamatsu T. Intracellular dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 39-46.
- 27) Murayama Y, Harada Y, Imaizumi K, Dai P, Nakano K, Okamoto K, Otsuji E, Takamatsu T. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2009; 125: 2256-63.
- 28) Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T. Fine depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy using low-frequency bandpass filtering. *Opt Express* 2011; 19: 13365-13377.
- 29) Imaizumi K, Harada Y, Wayabayashi N, Yamaoka Y, Konishi H, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas. *Gastrointest Endosc* 2012; 75: 110-117.
- 30) Hatakeyama T, Dai P, Harada Y, Hino H, Tsukahara F, Maru Y, Otsuji E, Takamatsu T. Connexin43 functions as a novel interacting partner of heat shock cognate protein 70. *Sci Rep* 2013; 3: 2719.
- 31) Minamikawa T, Harada Y, Koizumi N, Okihara K, Kamoi K, Yanagisawa A, Takamatsu T. Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy. *Histochem Cell Biol* 2013; 139: 181-193.
- 32) Matsuyama T, Tanaka H, Adachi T, Jiang Y, Ishibashi-Ueda H, Takamatsu T. Intrinsic left atrial Histoanatomy as the basis for reentrant excitation causing atrial fibrillation/flutter in rats. *Heart Rhythm* 2013; 10: 1342-1348.
- 33) Koizumi N, Harada Y, Murayama Y, Harada K, Beika M, Yamaoka Y, Dai P, Komatsu S, Kubota T, Ichikawa D, Okamoto K, Yanagisawa A, Otsuji E, Takamatsu T. Detection of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 3541-3548.
- 34) Dai P, Harada Y, Miyauchi H, Tanaka H, Kitano S, Adachi T, Suzuki T, Hino H, Takamatsu T. Combining TGF- $\beta$  signal inhibition and connexin43 silencing for iPSC induction from mouse cardiomyocytes. *Sci Rep* 2014; 4: 7323.
- 35) Miyawaki K, Harada Y, Wakabayashi N, Imaizumi K, Koizumi N, Nakano K, Yamaoka Y, Dai P, Itoh Y, Takamatsu T. In vivo detection of rat colorectal cancers by using dual-wavelength excitation method. *Acta Histochem Cytochem* 2014; 47: 247-254.
- 36) Nishiki-Muranishi N, Harada Y, Minamikawa T, Yamaoka Y, Dai P, Yaku H, Takamatsu T. Label-free evaluation of myocardial infarction and its repair by spontaneous Raman spectroscopy. *Anal Chem* 2014; 86: 6903-6910.
- 37) Yamaoka Y, Harada Y, Sakakura M, Minamikawa T, Nishio S, Maehara S, Hamano S, Tanaka H, Takamatsu T. Photoacoustic microscopy using ultrashort pulses with two different pulse duration. *Opt Express* 2014; 22: 17063-17072.
- 38) Hino H, Dai P, Yoshida T, Hatakeyama T, Harada Y, Otsuji E, Okuda T, Takamatsu T. Interaction of Cx43 with Hsc70 regulates G1/S transition through CDK inhibitor p27. *Sci Rep* 2015; 5: 15363.
- 39) Minamikawa T, Harada Y, Takamatsu T. Ex vivo peripheral nerve detection of rats by spontaneous Raman spectroscopy. *Sci Rep* 2015; 5: 17165.

## 著者プロフィール



高松 哲郎 Teturo Takamatsu

- 学 歴：1974年3月15日 京都府立医科大学医学部卒業  
1978年4月1日 京都府立医科大学大学院医学研究科（内科系）入学  
1982年3月31日 京都府立医科大学大学院医学研究科を所定単位を修得の上退学  
1987年10月1日 米国留学，メリーランド州立大学医学部生理学教室  
1989年6月30日 帰国
- 職 歴：1974年5月1日 京都府立医科大学附属病院研修医，小児科勤務  
1976年4月1日 福井愛育病院医員，小児科勤務  
1982年4月1日 愛生会山科病院部長，小児科勤務  
1982年10月1日 京都府立医科大学助手，第二病理学教室勤務  
1989年10月1日 京都府立医科大学講師，第二病理学教室勤務  
1991年4月1日 京都府立医科大学助教授，第二病理学教室勤務  
1995年4月1日 京都府立医科大学教授，第二病理学教室勤務  
1999年4月1日 京都府立医科大学学生部長兼務（2003年3月31日まで）  
2003年4月1日 京都府立医科大学大学院医学研究科教授（統合医科学専攻）  
2012年1月1日 京都府立医科大学副学長兼務（2013年3月31日まで）  
2015年4月1日 京都府立医科大学特任講座教授，医学フォトリニクス講座勤務現在に至る